

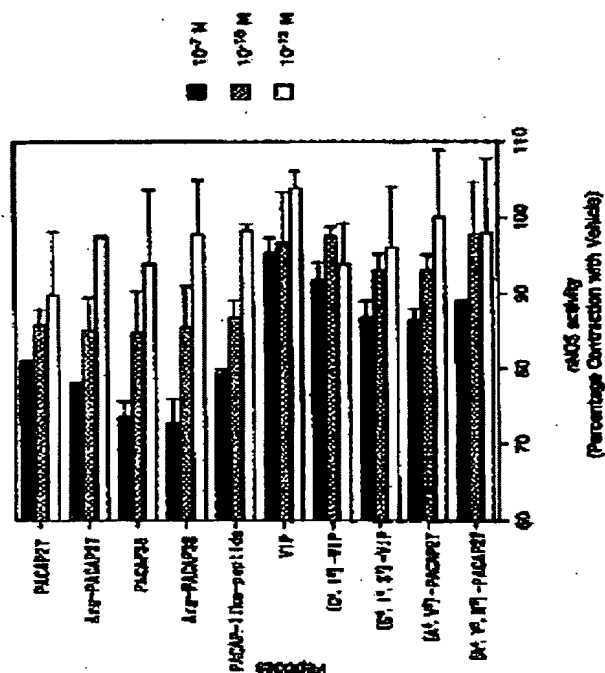
NEUROTOXIN TOXICITY-REDUCING AGENT

Patent number: JP2003073301
Publication date: 2003-03-12
Inventor: ONOE MASAYOSHI; KASHIMOTO KAZUHISA
Applicant: ITOHAM FOODS INC
Classification:
- international: A61K38/22; A61P7/02; A61P9/10; A61P25/00;
A61P25/14; A61P25/16; A61P25/28; A61P39/02;
A61P43/00; C07K14/00
- european:
Application number: JP20010386706 20011219
Priority number(s): JP20010189446 20010622; JP20010386706 20011219

Report a data error here

Abstract of JP2003073301

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a neurotoxin toxicity-reducing agent and a medicinal composition containing the same.
SOLUTION: This neurotoxin toxicity-reducing agent contains a peptide consisting of at least 23 residues from its N-terminal among peptides expressed by the following formula (I): His-Ser-Asp-A-B-Phe-Thr-Asp-C-Tyr-D-Arg-E-Arg-F- Gln-G-Ala-Val-I-J-Tyr-Leu-K-L-M-Leu-N (I) (wherein, A is Ala or Gly; B is Ile or Val; C is Asn or Ser; D is Thr or Ser; E is Leu or Tyr; F and J are each Lys or Arg; I is Lys, Arg or Gln, provided that at least one of F, I and J is Arg; G is Met, Leu or nLeu; K is Asn or Ala; L is Ser or Ala; M is Ile or Val; and N is -NH₂ or Asn-NH₂) or its pharmaceutically permissible salt as an active ingredient.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-73301

(P2003-73301A)

(43) 公開日 平成15年3月12日 (2003.3.12)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード ⁸ (参考)
A 6 1 K 38/22		A 6 1 P 7/02	4 C 0 8 4
A 6 1 P 7/02		9/10	4 H 0 4 5
9/10		25/00	
25/00		25/14	
25/14		25/16	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-386706 (P2001-386706)

(22) 出願日 平成13年12月19日 (2001.12.19)

(31) 優先権主張番号 特願2001-189446 (P2001-189446)

(32) 優先日 平成13年6月22日 (2001.6.22)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成13年3月5日
 社団法人日本薬学会発行の「日本薬学会第121年会要旨
 集」に発表

(71) 出願人 000118497

伊藤ハム株式会社

兵庫県神戸市灘区備後町3丁目2番1号

(72) 発明者 尾上 誠良

茨城県北相馬郡守谷町久保ヶ丘1丁目2番

伊藤ハム株式会社中央研究所内

(72) 発明者 榎本 和久

茨城県北相馬郡守谷町久保ヶ丘1丁目2番

伊藤ハム株式会社中央研究所内

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経毒性低下剤

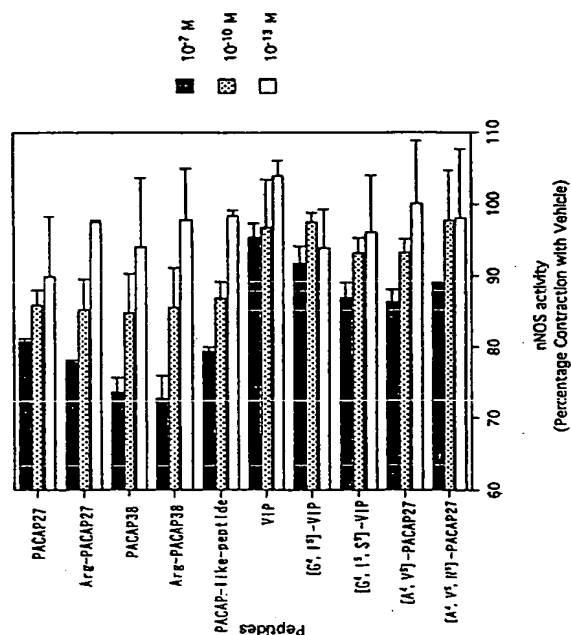
(57) 【要約】

【課題】 神経毒性低下剤及び該剤を含んでなる医薬組成物の提供。

【解決手段】 下記式(I):

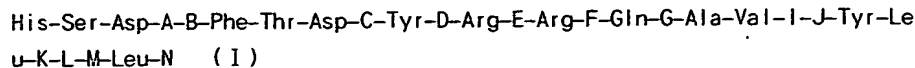
His-Ser-Asp-A-B-Phe-Thr-Asp-C-Tyr-D-Arg-E-Arg-F-Gln-G-Ala-Val-I-J-Tyr-Leu-K-L-M-Leu-N (I)

(式中、A は、Ala 又は Gly ; B は、Ile 又は Val ; C は、Asn 又は Ser ; D は、Thr 又は Ser ; E は、Leu 又は Tyr ; F 及び J は、それぞれ Lys 又は Arg を示し、I は Lys、Arg 又は Gln を示すが、F、I 及び J の少なくとも一つは Arg ; G は、Met、Leu 又は nLeu ; K は、Asn 又は Ala ; L は、Ser 又は Ala ; M は、Ile 又は Val ; N は、-NH₂ 又は Asn-NH₂ を示す。)で示されるペプチドのうち、N末端より少なくとも23残基からなるペプチド又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する、神経毒性低下剤。



【特許請求の範囲】

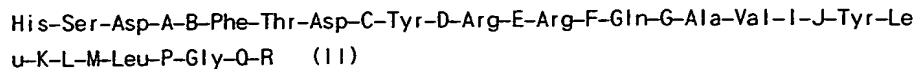
【請求項1】 下記式(I)



(式中、A は、Ala 又は Gly ; B は、Ile 又は Val ; C は、Asn 又は Ser ; Dは、Thr 又は Ser ; E は、Leu 又は Tyr ; F及びJ は、それぞれ Lys 又は Argを示し、IはLys、Arg 又はGlnを示すが、F、I 及び J の少なくとも一つは Arg ; G は、Met、Leu 又は nLeu ; K は、Asn 又は Ala ; L は、Ser 又は Ala; M は、Ile ※

※e 又は Val ; N は、-NH₂ 又は Asn-NH₂を示す。)で示されるペプチドのうち、N末端より少なくとも23残基からなるペプチド又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する、神経毒性低下剤。

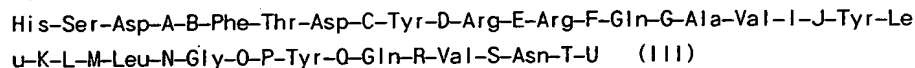
【請求項2】 下記式(II) :



(式中、A は、Ala 又は Gly ; B は、Ile 又は Val ; C は、Asn 又は Ser ; Dは、Thr 又は Ser ; E は、Leu 又は Tyr ; F及びJ は、それぞれ Lys 又は Argを示し、IはLys、Arg 又はGlnを示すが、F、I 及び J の少なくとも一つは Arg ; G は、Met、Leu 又は nLeu ; K は、Asn 又は Ala ; L は、Ser 又は Ala; M は、Ile ※

※e 又は Val ; P は、Asn 又は化学結合 ; O は、Lys、Arg、Lys-Arg、Arg-Arg 又は化学結合 ; R は、-OH 又は -NH₂ を示す。)で示されるペプチド又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する、神経毒性低下剤。

【請求項3】 下記式(III) :



(式中、A は、Ala 又は Gly ; B は、Ile 又は Val ; C は、Asn 又は Ser ; Dは、Thr 又は Ser ; E は、Leu 又は Tyr ; F、J、O、P、Q、R、S、T は、それぞれ Lys 又は Argを示し、IはLys、Arg 又はGlnを示すが、F、I 及び J の少なくとも一つは Arg ; G は、Met、Leu 又は nLeu ; K は、Asn 又は Ala ; L は、Ser 又は Ala ; M は、Ile 又は Val ; N は、化学結合又は Asn ; U は-OH 又は -NH₂ を示す。)で示されるペプチド又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する、神経毒性低下剤。

【請求項4】 過剰に産生された一酸化窒素に起因する疾病の治療薬である、請求項1、2または3記載の剤。

【請求項5】 β-アミロイドの蓄積に起因する疾病の治療薬である、請求項1、2または3記載の剤。

【請求項6】 疾病が脳血栓虚血、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病又はハンチントン病である、請求項5記載の剤。

【請求項7】 請求項1～6のいずれか1項に記載の剤を含んでなる医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、神経毒性低下剤、詳しくは、血管作働性腸管ペプチド(VIP)、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ペプチド(PACAP)又はその誘導体、その薬学的に許容され得る塩を有効成分として含有する神経毒性低下剤、並びに該剤を含んでなる医薬組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】Harris により提唱された「腺性下垂体は、視床下部で産生され門脈を介して下垂体前葉に運ばれる体液性因子によりコントロールされる」という仮説

に基づき、過去30年の間に甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン(TRH)、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LH-RH)、成長ホルモン分泌抑制ホルモン(ソマトスタチン)、成長ホルモン放出因子(GRH)、副腎皮質刺激ホルモン放出因子(CRH)といった視床下部ホルモンが同定されてきた。これらの物質は神経伝達物質や神経機能調節因子として作用する神経ペプチドであり、視床下部からの放出後、下垂体に作用し、各種刺激に応じたホルモンの分泌の促進や抑制を行う。しかし、上記物質ですべての神経ペプチドが同定されたかどうかは議論のあるところである。そこで有村らは、従来の神経ペプチドに対する分離・同定の戦略を変え、分離のための指標として下垂体前葉細胞中の細胞内情報伝達系(特に、CRH、GRHによるGH、ACTHの分泌に重要であるcAMP系)の活性化を指標とし、視床下部から新たな神経ペプチドの分離を試み、最終的にそれを同定した(Miyata A et al, Biochem Biophys Res Commun (1989), 164, 567-574)。そして、このペプチドは下垂体のアデニレートシクラーゼ(adenylate cyclase)の活性化を指標として分離されたことから、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ペプチド(Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide、以下、PACAPと称する)と名付けられた。

【0003】また、PACAPよりも先に天然より見出された神経ペプチドとして血管作働性腸管ペプチド(Vasoactive Intestinal Peptide、以下、VIPと称する)がある。VIPは腸管から分泌される神経ペプチドの一種であり、消化管平滑筋弛緩の作用を有し、また、PACAPのN末端側からの27個のアミノ酸配列はVIPと極めて類似した構造を有している。VIPとPACAPは、ペプチドの長さ、シーケンス及びC末端がアミド化されているという点でセクレチン、グルカゴン等と共通点が多いことから、一

3 般にグルカゴン-セクレチンファミリーに属している。

【0004】一方、PACAP及びVIPの他にも、生体内において多くの神経伝達物質が神経伝達から興奮毒性まで神経化学全般にわたって深く関与していることがわかっている。近年の分子生物学的手法の発達によりそれら物質および受容体の解明が進み、著しい多様性を持つことが明らかになった。特に、数多くの神経伝達物質の中で注目を集めているのは、様々なホルモン分泌促進作用と顕著な毒性作用という生体にとって有益な作用と有害な作用を併せ持つ一酸化窒素（以下、NOと称する）であり、10 現在ではその合成酵素も含めた多彩な研究がなされている。NOはガス状ラジカル物質であり、容易に細胞間に拡散し、標的分子に作用して各種活性を示すが、過剰に生体内において産生された場合には神経細胞に対して毒性を示す。この主たる毒性は、NOラジカルによる細胞膜損傷及びDNA損傷に起因するとされている。すなわち、生体内で生成されたNOラジカルは、それ自体毒性を有するが、さらに酸素分子と反応してペルオキシナイトレートイオン（ONOO⁻）を生じて強い毒性を示す。この後者の物質こそが毒性の本体であるとも言われている。

【0005】また、NOを生体内にて産生するNO合成酵素（NO synthase、以下、NOSと称する）も同定され、3種類のアイソフォームが報告されている。第一の酵素は神経型NOS（neuronal nitric oxide synthase、以下、nNOSと称する）である。この酵素は主として神経系に発現するが、その後、脾臓、腎臓、肝臓、胃、子宮にも存在することが明らかになっている。第二の酵素は、性質上は前記nNOSとよく似た、内皮型NOS（endothelial nitric oxide synthase、以下、eNOS）である。この酵素は主に血管内皮に存在し、血圧の調節に関係している。nNOS及びeNOSはともに活性にカルシウムイオンを必要とする。第三の酵素は誘導型NOS（inducible nitric oxide synthase、以下、iNOSと称する）である。この酵素は主にグリア細胞やマクロファージに存在し、活性にカルシウムイオンを必要としない。

【0006】これらの酵素の中で、特に神経細胞死に関与していると言われているのはnNOSである。nNOSはnNOS活性化物質によって活性化される。nNOS活性化物質とは、NOSを刺激し活性化する物質を意味し、その多くは興奮性物質として定義付けられてきた化合物であり、細胞内カルシウムイオンの濃度を上昇させるという共通した特徴を有している。なお、nNOS活性化物質としては、具体的には、グルタミン酸、カイニン酸、キスカル酸等があり、そのうちグルタミン酸が最も代表的である。また、おそらく今後も実に多くのnNOS活性化物質が見いだされると予想される。

【0007】これらnNOS活性化物質によるNO産生にはnNOS活性化物質特異的受容体の一種、N-メチル-D-アスパラギン酸型受容体（以下、NMDA型受容体と称する）が関与している。NMDA型受容体を介したNO産生のメカニズムは

4 次のとおりである。すなわち、細胞外に流出したグルタミン酸等のnNOS活性化物質がNMDA型受容体を活性化し、それによって該受容体が開かれる。開かれた受容体を介して細胞外から細胞内へカルシウムイオンの流入が起きる。その結果、カルシウムイオン依存性であるnNOSおよびeNOSが活性化され、NOが産生される。この産生されたNOが過剰量である場合に生体内の神経細胞に対して毒性を示す。

【0008】このnNOSに関する現象は単にin vitroのみで語られているものではなく、in vivoでも検証されている。例えば、遺伝的にnNOSを欠損させたnNOSノックアウトマウスを用いて脳虚血による海馬神経細胞の脱落を検討した結果、nNOSノックアウトマウスでは正常マウスと比較して脳虚血時の傷害が軽減することが明らかにされた。この知見は、nNOSによって産生されたNOが脳虚血による神経細胞死のメディエーターの一つとして作用することを示唆するものである。また、アルツハイマー病の原因とされるβ-アミロイドによってもNOが用量依存的に産生されており、本疾患のメカニズムの一つに「カルシウム-NO経路」が存在している可能性が強く示唆されている。

【0009】ところで、前記PACAP及びVIPペプチドとその特異的受容体は、生体内の極めて広範囲にわたって分布し、同時に、時としてNOSとの共存がよく確認されており、これら両者の関係が注目されている。例えば、PACAP及びVIPペプチドの代表的な気管支平滑筋弛緩作用にもeNOS活性化による経路が関与していると考えられているが、このことは、PACAP及びVIPの弛緩作用が、NOS阻害剤添加によって有意に阻害されることから明らかである。

【0010】従って、NOS含有ニューロンに多く分布が認められているPACAPやVIPは神経毒性に関しての何らかの作用を示すことが考えられるが、現在、nNOSによる毒性とこれら神経ペプチドとの因果関係を明確に示す報告はなされていない。また、PACAP、VIP又はその誘導体がNO産生を抑制し、神経毒性を低下させるということも報告されていない。

【0011】一方、脳卒中、老年痴呆、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病等の神経変性疾患に対して種々の治療剤が用いられてきているが、例えば、抗痴呆薬としてコリンエステラーゼ阻害薬のタクリンには肝機能障害が、パーキンソン病治療薬としてのドーパミン受容体刺激剤やドーパ剤等には、消化器症状や精神症状などの副作用が認められている。そのため、神経変性疾患の症状を治療、予防できるとともに、副作用が低減された治療薬の開発が求められている。

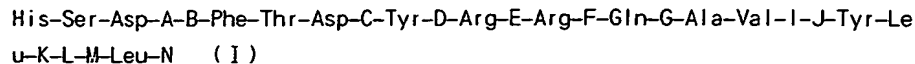
【0012】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、神経毒性低下剤及び該剤を含んでなる医薬組成物を提供することを

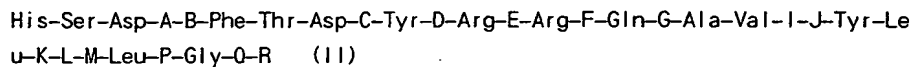
目的とする。

【0013】

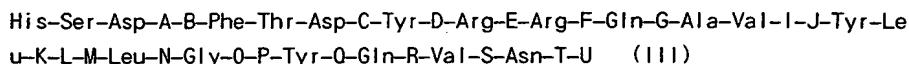
【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、NO産生起因の神経毒性に対して低下作用を有するペプチドを見出し、*



(式中、A は、Ala 又は Gly ; B は、Ile 又は Val ; C は、Asn 又は Ser ; Dは、Thr 又は Ser ; E は、Leu 又は Tyr ; F及びJ は、それぞれ Lys 又は Argを示し、IはLys、Arg 又はGln を示すが、F、I 及び J の少なくとも一つは Arg ; G は、Met、Leu 又は nLeu ; K は、Asn 又は Ala ; L は、Ser 又は Ala; M は、Ile ※



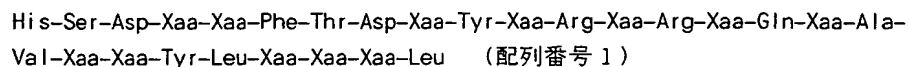
(式中、A は、Ala 又は Gly ; B は、Ile 又は Val ; C は、Asn 又は Ser ; Dは、Thr 又は Ser ; E は、Leu 又は Tyr ; F及びJ は、それぞれ Lys 又は Argを示し、IはLys、Arg 又はGln を示すが、F、I 及び J の少なくとも一つは Arg ; G は、Met、Leu 又は nLeu ; K は、Asn 又は Ala ; L は、Ser 又は Ala; M は、Ile ★



(式中、A は、Ala 又は Gly ; B は、Ile 又は Val ; C は、Asn 又は Ser ; Dは、Thr 又は Ser ; E は、Leu 又は Tyr ; F、J、O、P、Q、R、S、T は、それぞれ Lys 又は Arg を示し、IはLys、Arg 又はGln を示すが、F、I 及び J の少なくとも一つは Arg ; G は、Met、Leu 又は nLeu ; K は、Asn 又は Ala ; L は、Ser 又は Ala ; M は、Ile 又は Val ; N は、化学結合又は Asn ; U は-OH 又は -NH₂ を示す。)で示されるペプチド又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する、神経毒性低下剤。

【0017】(4) 過剰に産生された一酸化窒素に起因する疾病の治療薬である、(1) (2) または (3) 記載の剤。

(5) β-アミロイドの蓄積に起因する疾病の治療薬である、(1)、(2) または (3) 記載の剤。



Gly-Lys (配列番号2)

Gly-Arg (配列番号3)

Gly-Lys-Arg (配列番号4)

Gly-Arg-Arg (配列番号5)

Asn-Gly-Lys (配列番号6)

Asn-Gly-Arg (配列番号7)

Asn-Gly-Lys-Arg (配列番号8)

Asn-Gly-Arg-Arg (配列番号9)

Gly-Xaa-Xaa-Tyr-Xaa-Gln-Xaa-Val-Xaa-Asn-Xaa (配列番号10)

Asn-Gly-Xaa-Xaa-Tyr-Xaa-Gln-Xaa-Val-Xaa-Asn-Xaa (配列番号11)

*本発明を完成するに至った。

【0014】すなわち、本発明は、以下の(1)～(7)を提供する。

(1) 下記式(I):

※e 又は Val ; N は、-NH₂ 又は Asn-NH₂を示す。)で示されるペプチドのうち、N末端より少なくとも23残基からなるペプチド又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する、神経毒性低下剤。

【0015】(2) 下記式(II):

★e 又は Val ; P は、Asn 又は化学結合; Q は、Lys、Arg、Lys-Arg、Arg-Arg 又は化学結合; R は、-OH 又は -NH₂ を示す。)で示されるペプチド又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する、神経毒性低下剤。

【0016】(3) 下記式(III):

(6) 疾病が脳血栓虚血、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病又はハンチントン病である、(5)記載の剤。

(7) (1)～(6)のいずれかに記載の剤を含んでなる医薬組成物。以下、本発明についてさらに詳細に説明する。

【0018】

【発明の実施の形態】本発明の神経毒性低下剤の有効成分であるペプチドは、具体的には、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドのうち、N末端より少なくとも23残基からなるペプチド、又は配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドのC末端に、Asnまたは配列番号2～11のいずれかに記載のアミノ酸配列が付加したアミノ酸配列からなるペプチドである。

【0019】

7

【0020】上記ペプチドのN末端のアミノ基には、極性物質又は非極性物質を結合させて分子の極性を変化させたり、ポリエチレングリコール、グルコサミノグリカン（ヒアルロン酸等）の高分子を結合させて酵素耐性を持たせたり、該アミノ酸をリボソーム基質に結合させてリボソームに封入する、あるいは脂質膜表面に固定することもできる。また、上記ペプチドのC末端は、 $-OH$ 、 $-NH_2$ のいずれでもよい。

【0021】具体的には、PACAP38（ペプチド1：配列番号12）、PACAP27（ペプチド2：配列番号13）、VIP（ペプチド3：配列番号14）、PACAPの誘導体であるArg-PACAP38（ペプチド4：配列番号15）、PACAP-like-peptide（ペプチド5：配列番号16）、Arg-PACAP27（ペプチド6：配列番号17）、 $[A^4, V^5]$ -PACAP27（ペプチド7：配列番号18）及び $[A^4, V^5, N^9]$ -PACAP27（ペプチド8：配列番号19）、VIPの誘導体である $[G^4, I^5]$ -VIP（ペプチド9：配列番号20）及び $[G^4, I^5, S^9]$ -VIP（ペプチド10：配列番号21）、VIPの高塩基性誘導体であるVIP高塩基性誘導体A（ペプチド11：配列番号22）、VIP高塩基性誘導体B（ペプチド12：配列番号23）、VIP高塩基性誘導体C（ペプチド13：配列番号24）及びVIP高塩基性誘導体D（ペプチド14：配列番号25）、PACAP27の高塩基性誘導体であるPACAP27高塩基性誘導体A（ペプチド15：配列番号26）、PACAP27高塩基性誘導体B（ペプチド16：配列番号27）及びPACAP27高塩基性誘導体C（ペプチド17：配列番号28）、VIP/PACAP高塩基性キメラペプチド（ペプチド18：配列番号29）、PACAP short form（ペプチド19：配列番号30）及びVIP short form（ペプチド20：配列番号31）がある。

【0022】本発明のグルタミン酸起因の神経毒性に対する低下作用剤に使用するペプチドは、公知のペプチド合成の常法に従って合成できる。例えば、「ザ・ペプチド(The Peptides)」第1巻(1966年) [Schreder and Luhe 著、Academic Press, New York, U.S.A.]、あるいは「ペプチド合成」[泉屋ら著、丸善株式会社(1975年)]の記載に従い、具体的には、アジド法、酸クロライド法、酸無水物法、混合酸無水物法、DCC法、活性エステル法(P-ニトロフェニルエステル法、N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル法、シアノメチルエステル法など)、ウッドワード試薬Kを用いる方法、カルボイミダゾール法、酸化還元法、DCC-アディティブ(HONB、HOBt、HONSu)法など、各種の方法により合成することができる。これらの方法は、固相合成及び液相合成のいずれにも適用できる。

【0023】本発明におけるペプチド合成は、上記のような一般的なポリペプチドの合成法、例えば、末端アミノ酸に順次1個ずつアミノ酸を縮合させるいわゆるステップワイズ法、または数個のフラグメントに分けてカップリングさせていく方法によって行われる。

【0024】例えば、ステップワイズ法による固相合成

8

は、具体的には、メリフィールド(Merrifield, R.B.)の方法 [Solid phase peptide synthesis, J. Amer. Chem. Soc., 85, 2149-2159 (1963)] に従い、以下のようにして行うことができる。まず、C末端アミノ酸（アミノ基を保護したもの）をそのカルボキシル基によって不溶性樹脂に結合させ、その後、該C末端アミノ酸のアミノ基の保護基を除去する。次いで、得られたこの遊離の反応性アミノ基に、目的とするペプチドのアミノ酸配列に従って、アミノ基を保護したアミノ酸の反応性カルボキシル基を縮合反応により順次結合させる。このようにして一段階ずつ全配列を合成した後、ペプチドを不溶性樹脂からはずす。

【0025】上記の固相合成において用いられる不溶性樹脂は、反応性カルボキシル基との結合性を有するものであればいずれをも使用できる。例えば、クロロメチル樹脂、オキシメチル樹脂、4-オキシメチルフェニルアセタミドメチル樹脂(PAM樹脂)、ベンズヒドリルアミン樹脂(BHA樹脂)、アミノメチル樹脂、メチルベンズヒドリル樹脂(MBHA樹脂)、4-アミノメチルフェノキシメチル樹脂、4-ヒドロキシメチルフェノキシメチル樹脂などが挙げられる。

【0026】また、 α -アミノ基の保護基として9-フルオレンメチルオキシカルボニル基(Fmoc)を使用する場合は、4-ヒドロキシメチルフェノキシメチル樹脂など、トリフルオロ酢酸(TFA)によって樹脂から脱離できるものがよく、 t -ブトキシカルボニル基(Boc)を使用する場合には、4-オキシメチルフェニルアセタミドメチル樹脂(PAM樹脂)など、フッ化水素などによって樹脂から脱離できるものがよい。樹脂1g当りのペプチド濃度は0.5mmole以下とすることが好ましい。

【0027】上記の方法においては、アミノ酸のペプチド結合に関与するアミノ基への保護基の結合及び該保護基の脱離、並びにアミノ酸のペプチド結合に関与するカルボキシル基の活性化が必要である。アミノ基の保護基としては、例えば、ベンジルオキシカルボニル(Z)、 t -ブトキシカルボニル(Boc)、 t -アミノオキシカルボニル(Aoc)、イソボニルオキシカルボニル、 p -メトキシベンジルオキシカルボニル、2-クロロベンジルオキシカルボニル、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、 o -ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオールなどの基が挙げられる。

【0028】また、アミノ酸の中で、側鎖に官能基を有するもの、例えば、His、Tyr、Thr、Lys、Asp、Arg及びSerは、その側鎖の官能基を保護しておくのが好ましい。官能基の保護は、下記のような保護基を通常用いられている方法で上記アミノ酸に結合させ、反応終了後、該保護基は脱離される。Hisのイミノ基の保護基としては、例えばベンジルオキシメチル(Bom)、 p -トルエンスルホニル(Tos)、ベンジル(Bzl)、ベンジルオキシ

カルボニル (Z)、トリチル基などが挙げられる。

【0029】Ser及びThrの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができるが、この保護は必須ではない。エステル化に適する基としては、アセチルなどの低級アルカノイル基、ベンゾイルなどのアロイル基、ベンゾイルオキシカルボニル、エチルオキシカルボニルなどの炭酸から誘導される基などが挙げられる。また、エーテル化に適する基としては、ベンジル (Bzl)、テトラヒドロピラニル、tert-ブチル基などが挙げられる。

【0030】Tyrの水酸基の保護基としては、例えば、ベンジル (Bzl)、プロモベンジルオキシカルボニル (Br-Z)、ジクロロベンジル (Cl₂-Bzl)、ベンジルオキシカルボニル (Z)、アセチル、p-トルエンスルホニル (Tos) 基などが挙げられる。Lysのアミノ基の保護基としては、例えば、ベンジルオキシカルボニル (Z)、クロロベンジルオキシカルボニル (Cl-Z)、ジクロロベンジル (Cl₂-Bzl)、t-ブトキシカルボニル基 (Boc)、p-トルエンスルホニル (Tos) 基などが挙げられる。

【0031】Argのグアニジノ基の保護基としては、例えば、p-トルエンスルホニル (Tos)、ニトロ、ベンジルオキシカルボニル (Z)、t-アミルオキシカルボニル (Aoc) 基などが挙げられる。Aspのカルボキシル基の保護は、例えば、ベンジルアルコール、メタノール、エタノール、tert-ブタノール、シクロヘキシル (cHex) などによるエステル化により行われる。

【0032】その他のアミノ酸の保護基として、Trpのインドリル基の保護基としては、例えば、ホルミル、カルボベンゾキシル、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、2,2,2-トリクロロエチルオキシカルボニルなどが挙げられるが、この保護は必須ではない。Metのチオメチル基の保護基としては、予めメチルスルホキシドにして置き、後に還元する方法があるが、この保護は必須ではない。

【0033】一方、カルボキシル基の活性化は、従来公知の方法にて行うことができ、用いられる試薬なども公知のものから適宜選択しえる。例えば、カルボキシル基の活性化は、該カルボキシル基と種々の試薬とを反応させ、対応する酸クロライド、酸無水物または混合酸無水物、アジド、活性エステル (ペンタクロロフェノール、p-ニトロフェノール、N-ヒドロキシコハク酸イミド、N-ヒドロキシベンズトリアゾール、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド等とのエステル) などを形成させることにより行う。

【0034】上記の固相における反応性アミノ基と反応性カルボキシル基との縮合反応 (ペプチド結合形成反応) に用いる溶媒としては、ペプチド結合形成に使用できるものであればいずれでもよい。例えば、無水または含水のジメチルホルムアミド (DMF)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、ピリジン、クロロホルム、ジオキサ

ン、ジクロロメタン (DCM)、テトラヒドロフラン (THF)、酢酸エチル、N-メチルピロリドン、ヘキサメチルリン酸トリアミド (HMPA) などを単独で、あるいは2種以上の混合溶媒として使用することができる。

【0035】また、上記縮合反応は、縮合剤、例えばジシクロヘキシルカルボキシイミド (DCC)、カルボジイミダゾールなどのカルボジイミド試薬やテトラエチルピロホスフェイト、ベンゾトリアゾール-N-ヒドロキシトリスジメチルアミノホスホニウムヘキサフルオロリン化合物塩 (Bop試薬) などの存在下に行うこともできる。

【0036】得られたペプチドは、通常の方法に従い脱塩、精製することができる。例えば、DEAE-セルロースなどのイオン交換クロマトグラフィー、セファデックス LH-20、セファデックス G-25 などの分配クロマトグラフィー、シリカゲルなどの順相クロマトグラフィー、ODS-シリカゲルなどの逆相クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなどが挙げられる。上記のようにして得られた精製ペプチドは、各種の酸を用いて、所望により薬学的に許容される塩、例えば、酢酸塩、塩酸塩、リン酸塩などにすることが出来る。

【0037】上記のようにして調製したペプチド及びその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する剤は、神経毒性低下作用を有する。ここで、神経毒性とは、神経変性疾患をもたらす生体内で過剰に産生されたNOによる毒性を意味する。具体的には、グルタミン酸などのnNOS活性化物質が大量に遊離した場合、nNOS活性化物質特異的受容体が過剰に反応し、過剰に産生されたNOによって結果的に神経細胞の恒常性が失われて細胞死に至る神経毒性であり、例えば、実験医学 (1994) 12, 195-200 にも報告されている。また、神経毒性低下作用とは、nNOS活性を阻害し、NO産生を抑制することによって前記神経毒性を低下させることができる作用のことを意味する。例えば、この作用については、被検物質の存在下で試験対象の細胞にグルタミン酸などのnNOS活性化物質を添加して刺激した後、nNOS活性、NO産生量、細胞死数の検出を行い、神経毒性低下作用物質を存在させなかったコントロールにおけるそれらの測定値よりも低い値の場合に、NO産生抑制効果や細胞死抑制効果が認められ、神経毒性低下作用有りであると判断することができる。

【0038】本発明のペプチド及び誘導体は神経毒性低下作用を有するが、PACAP及びVIPに比べてそれぞれの誘導体にはさらなる強力な活性と臨床的に望ましい補助的な効果が認められる。例えば、Arg-PACAP38 や Arg-PACAP27 をはじめとする塩基性アミノ酸置換誘導体群は生体内におけるペプチダーゼに対して極めて強い耐性を有しており、このことは Peptide Chemistry (1996) 249-252 に明記されている。一般的にペプチド・タンパク質は生体内において速やかに代謝されるようになっているが、この代謝課程を担う重要物質の一つがペプチダーゼである。したがってこのペプチダーゼに対する耐性は生

11

体内での本塩基性アミノ酸置換誘導体群の作用時間延長をもたらし、慢性的な疾病である中枢変性疾患に対して極めて有効である。この結果は投与回数の低減とそれに伴う薬価の低下をもたらす、医療経済学的に考慮しても顕著な効果であると考えられる。さらに、N末端を変化させた誘導体群は、PACAPが有する一過性の気管支平滑筋収縮作用を示さず、臨床的に使用した場合に想定される対象患者の幅を広くすることが可能である。以上の補助的な効果を有する誘導体は、PACAP及びVIPに比べて優れた神経毒性低下作用を示しており、特に、PACAP誘導体ではArg-PACAP38（ペプチド4；配列番号16）、Arg-PACAP27（ペプチド6；配列番号18）、PACAP27 高塩基性誘導体A（ペプチド15；配列番号26）、PACAP27 高塩基性誘導体B（ペプチド16；配列番号27）、PACAP27 高塩基性誘導体C（ペプチド17；配列番号28）、VIP誘導体では[G⁴, I⁵, S⁹]-VIP（ペプチド10；配列番号22）においてその作用が顕著である。

【0039】過剰産生されたNOが起因する神経毒性が関与する疾患としては、脳卒中等脳血栓虚血、ALS、あるいはパーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病等の神経変性疾患が挙げられ、本発明のペプチド及びその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する神経毒性低下剤はこれら疾患の治療及び予防に有効である。

【0040】本発明のペプチド及びその塩を上記疾患の患者の治療に使用する場合には、そのまま投与することができる。さらに、本発明のペプチド及びその塩と、公知の方法により薬学的に許容される種々の担体及びその他の成分とを混合し、液状、固体状の中枢神経系に作用させる非経口、経口、エアゾル、経肺、経皮、経鼻又は眼球投与のための医薬組成物としても利用することができる。例えば、錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、散剤、顆粒剤、カプセル剤（ソフトカプセルを含む）、液剤、注射剤、坐剤、徐放剤などとして、経口的または非経口的（例、局所、直腸、静脈投与等）に安全に投与することができる。また、本発明の医薬組成物は、脳室内ポンプによって脳を直接的な標的にすることもできる。

【0041】本発明の医薬組成物に用いられる薬学的に許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質があげられる。例えば、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤；液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などが用いられる。また、必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤、吸着剤、湿潤剤などの添加物を用いることもできる。賦形剤としては、例えば、乳糖、白糖、D-マンニトール、デンプン、コーンスターチ、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸などが用いられる。滑沢剤としては、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシ

12

リカなどが用いられる。結合剤としては、例えば、結晶セルロース、白糖、D-マンニトール、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、デンプン、ショ糖、ゼラチン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどが挙げられる。崩壊剤としては、例えば、デンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、L-ヒドロキシプロピルセルロースなどが挙げられる。溶剤としては、例えば、注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油などが挙げられる。溶解補助剤としては、例えば、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウムなどが挙げられる。懸濁化剤としては、例えば、ステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリンなどの界面活性剤；例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどの親水性高分子などが用いられる。等張化剤としては、例えば、ブドウ糖、D-ソルビトール、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトールなどが挙げられる。緩衝剤としては、例えば、リン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩などの緩衝液などが挙げられる。無痛化剤としては、例えば、ベンジルアルコールなどが挙げられる。防腐剤としては、例えば、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などが挙げられる。抗酸化剤としては、例えば、亜硫酸塩、アスコルビン酸などが挙げられる。

【0042】本発明のペプチド及びその塩の投与量は、使用（検査）目的、被験者の年齢、体重、投与方法などにより適宜決定されるが、例えば、ヒトを含む哺乳動物に静脈内投与を行う場合、ペプチド量として一回あたり、0.1～100 μ gを使用することが好ましい。

【0043】

【実施例】以下に実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例1】（ペプチドの合成）

下記のアミノ酸配列を有するPACAP38、PACAP27、VIP（ペプチド1～3）及びこれらより誘導されるペプチド誘導体（ペプチド4～21）をそれぞれ通常のペプチド固相合成法に従い合成した。なお、各ペプチドのN末端は-H、C末端は-NH₂である。

【0044】(1) ペプチド1: PACAP38

His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Lys-Arg-Tyr-Lys-Gln-Arg-Val-Lys-Asn-Lys
(配列番号12)

(2) ペプチド2: PACAP27

His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu
(配列番号13)

(3) ペプチド3: VIP

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
(配列番号14)

(4) ペプチド4: PACAP誘導体Arg-PACAP38

His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Arg-Arg-Tyr-Arg-Gln-Arg-Val-Arg-Asn-Arg
(配列番号15)

(5) ペプチド5: PACAP誘導体PACAP-like-peptide (st argazer-PACAP)

His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Gln-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Arg-Arg-Tyr-Arg-Gln-Arg-Val-Arg-Asn-Lys
(配列番号16)

(6) ペプチド6: PACAP誘導体Arg-PACAP27

His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu
(配列番号17)

(7) ペプチド7: PACAP誘導体[A⁴, V⁵]-PACAP27

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu
(配列番号18)

(8) ペプチド8: PACAP誘導体[A⁴, V⁵, N⁹]-PACAP27

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu
(配列番号19)

(9) ペプチド9: VIP誘導体[G⁴, I⁵]-VIP

His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
(配列番号20)

(10) ペプチド10: VIP誘導体[G⁴, I⁵, S⁹]-VIP

His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn
(配列番号21)

(11) ペプチド11: VIP高塩基性誘導体A

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-Gly-Lys
(配列番号22)

(12) ペプチド12: VIP高塩基性誘導体B

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-Gly-Lys
(配列番号23)

u-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-Gly-Lys-Arg
(配列番号23)

(13) ペプチド13: VIP高塩基性誘導体C

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-Gly-Arg-Arg
(配列番号24)

(14) ペプチド14: VIP高塩基性誘導体D

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Arg-Gln-nLeu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-Gly-Arg-Arg
(配列番号25)

(15) ペプチド15: PACAP27 高塩基性誘導体A

His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Lys
(配列番号26)

(16) ペプチド16: PACAP27 高塩基性誘導体B

His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Lys-Arg
(配列番号27)

(17) ペプチド17: PACAP27 高塩基性誘導体C

20 His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Arg-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Arg-Arg
(配列番号28)

(18) ペプチド18: VIP/PACAP 高塩基性キメラペプチド
His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Arg-Gln-nLeu-Ala-Val-Arg-Arg-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-Gly-Arg-Arg-Tyr-Arg-Gln-Arg-Val-Arg-Asn-Arg
(配列番号29)

(19) ペプチド19: PACAP short form

30 His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu
(配列番号30)

(20) ペプチド20: VIP short form

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu
(配列番号31)

(21) ペプチド21: PACAP誘導体PACAP-like-peptide (st ingray-PACAP)

40 His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Lys-Arg-Tyr-Lys-Pro-Lys-Arg-Arg-Asn-Ser-Gly-Arg-Arg-Val-Phe-Tyr
(配列番号32)

【0045】[実施例2] PACAP及びVIP誘導体のnNOS阻害活性

脳・神経系研究におけるモデル系として用いられている、ラットの副腎髄質褐色細胞腫由来細胞、PC12細胞を使用してPACAP及びVIP群のnNOS阻害活性を検討した。5%ウマ血清及び5%新生仔ウシ血清含有 Dulbecco's modified minimum essential medium (DMEM) にて、PC12

15

細胞を5% CO₂/95% airの環境に37℃に保って培養した。トリプシンにてPC12細胞を培養フラスコからはがした後、24well培養プレートにて前記細胞を培養し(10⁵ cells/well)、実施例1で調製したPACAP38、PACAP27、VIP及びこれらより誘導されるペプチド誘導体(ペプチド1~7)の存在下においてグルタミン酸で刺激した際に放出されるNOを亜硝酸イオンとして算出した。定量には2,3-Diaminonaphthaleneを使用し、形成される蛍光色素量を亜硝酸イオンとして検出した。その結果を図1に示す。

【0046】図1から明かなように、PACAP及びPACAP誘導体が存在した場合、nNOS活性は低くなり、高いnNOS阻害活性を示している。一方、VIP及びVIP誘導体が存在した場合にもnNOS活性の抑制が認められたが、PACAP及びPACAP誘導体に比較してその効果は弱かった。また、PACAP及びVIPに対し、それぞれの誘導体の方が高いnNOS阻害活性を有することが明らかであった。一方、VIP誘導体のうち、PACAP受容体親和性を増加させたVIP誘導体、例えば、ペプチド7はVIPに比べて強いnNOS抑制作用を示した。以上の結果から、本発明のPACAP及びVIP誘導体にはnNOS抑制作用が認められ、特にPACAP誘導体にはその効果が著しいことが確認された。

【0047】【実施例3】NO産生と各種ペプチド類による細胞毒性抑制の検討

実施例2と同様に調製したPC12培養細胞にグルタミン酸(10⁻³ M)を添加し、その際に産生されるNOをモニタリングした。同時に、PACAP及びVIP、並びにNOS阻害剤(L-NAME)を添加した場合のNO産生についても同様にモニタリングを実施した。さらに15分間のグルタミン酸刺激の後、培地を新鮮なものに変更し、24時間培養したときの遅延型細胞死についてもトリパンブルーを用いた色素排除試験によって評価した。また、グルタミン酸にPC12細胞を短時間暴露する際に、本発明のPACAP及びVIP誘導体を添加し、その後の細胞死へ与える影響についても同じく検討を行った。その結果を図2に示す。

【0048】図2から明かなように、グルタミン酸添加による刺激により約2倍のnNOS活性が確認されたが、PACAP及びVIPを添加した群ではコントロールと近いデータを示し、PACAP及びVIPによるnNOS活性抑制効果が確認され、NOの産生が少量に抑えられることが明らかとなった。また、PACAP群を添加した場合には、NOS阻害剤であるL-NAMEを添加した場合と同様のNO産生抑制効果及び細胞死抑制効果があることが分かった。

【0049】【実施例4】β-アミロイドによる細胞死の検討

NOがアルツハイマー病の原因とされているβ-アミロイドによっても用量依存的に産生されることが示唆されていることから、本発明のペプチドのβ-アミロイドに対する影響を検討することとし、初めに、β-アミロイドによって神経細胞の細胞死が生じることを確認した。

16

【0050】実施例2と同様に培養したPC12細胞にβ-アミロイド(β-アミロイド1-42、アメリカンペプタイドカンパニー社)(10⁻³ M)を添加し、48時間培養し、生じる細胞死について検討した。β-アミロイドは約5 mg/mLの濃度で約24時間前処理を行い、凝集体(βシート構造に変化したフィブリル体)へと変換させた。細胞死については、細胞の膜状に常在し細胞死に伴う細胞膜の破壊によって外部へと放出される乳酸デヒドロゲナーゼを検出することによってモニタリングした。培地は3種類、すなわち、5%ウマ血清及び5%新生仔ウシ血清含有DMEM、0.25%ウマ血清及び0.25%新生仔ウシ血清含有DMEM、そして0.2μMインシュリン含有無血清DMEMを用いし、β-アミロイドによる細胞死を検討した。その結果を図3示す。0.2μMインシュリン含有無血清及び0.25%ウマ血清及び0.25%新生仔ウシ血清含有DMEMにおいては、コントロール対照群(β-アミロイド無添加群)と比して有意にβ-アミロイドによる細胞死が確認された。一方、DMEM 5%ウマ血清及び5%新生仔ウシ血清含有DMEM中でのPC12培養細胞は、48時間後においてもβ-アミロイドによる細胞死は確認されなかった。このことから、血清中成分が何らかの神経毒性低下に関与している可能性が示唆された。なお、以上の結果から、以降の実施例においては、0.2μMインシュリン含有無血清DMEMを用いることにした。

【0051】【実施例5】神経ペプチドPACAP27によるβ-アミロイドに対する神経毒性低下作用

実施例4と同様にPC12細胞を培養してβ-アミロイドを添加し、その際に神経ペプチドPACAP27を共存させてβ-アミロイドによる細胞死に対する神経毒性低下作用について確認した。細胞死は細胞から培地中への乳酸デヒドロゲナーゼ放出量検出にてモニタリングした。結果を図4に示す。β-アミロイドの存在下では経時的に細胞が死んでいく様が確認できた。また、24時間の培養ではそれほど細胞が死なず、ある程度の時間が経過してから細胞が死んでいくことから、β-アミロイドによる細胞死はアポトーシス誘導に起因している可能性が示唆された。一方、神経ペプチドPACAP27を添加した細胞群では、その細胞死が非常に強力に抑制されており、ほぼコントロールと同値であった。このことからPACAP類は極めて強力な神経毒性低下作用をβ-アミロイドに対して示すことが明らかとなった。

【0052】【実施例6】各種ペプチド類のβ-アミロイドに対する影響

すなわち、実施例2と同様に調製したPC12培養細胞にアミロイド(50μM)と各種PACAP関連神経ペプチド(ペプチド1、2、4、5、7、8、15、16、17、19及び21)、VIP関連神経ペプチド(ペプチド3、9、10、11、12、13、14、18及び20)を各々添加し、WST-8法によって生細胞数を算出し、アミロイドに対する各種ペプチドの影響について比較検討を行った。神経ペプチドが神経毒性低

下作用を有していたならば、神経ペプチド無添加の場合の生細胞数と明確な違いを認めることが出来る。各種神経ペプチドを添加したPC12細胞において、神経ペプチド無添加群よりも細胞生存率が高い ($P < 0.05$) 場合を神*

PACAP 関連神経ペプチド (10^{-9} M)

添加物	神経毒性低下作用	添加物	神経毒性低下作用
ペプチド無添加	-	ペプチド 8	+
ペプチド 1	+	ペプチド 15	+
ペプチド 2	+	ペプチド 16	+
ペプチド 4	+	ペプチド 17	+
ペプチド 5	+	ペプチド 19	+
ペプチド 6	+	ペプチド 21	+
ペプチド 7	+		

(+, $P < 0.05$ 神経ペプチド無添加群と比して)

【0054】

【表2】

VIP 関連神経ペプチド (10^{-7} M)

添加物	神経毒性低下作用	添加物	神経毒性低下作用
ペプチド無添加	-	ペプチド 12	+
ペプチド 3	+	ペプチド 13	+
ペプチド 9	+	ペプチド 14	+
ペプチド 10	+	ペプチド 18	+
ペプチド 11	+	ペプチド 20	+

(+, $P < 0.05$ 神経ペプチド無添加群と比して)

【0055】 【実施例7】 神経ペプチドPACAP27、VIP、humanin、細胞透過性cAMP誘導体による神経毒性低下作用

実施例2と同様にPC12細胞を培養して β -アミロイドを添加し、その際に神経ペプチドPACAP27、VIP、humanin、細胞透過性cAMP誘導体を各々共存させて β -アミロイドによる細胞死に対するそれらの影響を確認した。細胞死については、WST-8法による細胞数評価を行い、細胞の生存率を算出することによって検討した。その結果を図5に示す。 β -アミロイド存在下では約7割の細胞が死滅した。一方、cAMP誘導体であるdibutyryl-cAMPを共存させた場合には極めて強力に細胞死が抑制され、神経毒性低下作用が確認された。また、PACAP27 (10^{-9} M) も強力な神経毒性低下作用を明瞭に示した。PACAP類はcAMPの上昇を介して作用を示すことが知られているが、この結果は神経ペプチドの β -アミロイドに対する神経毒性低下作用もcAMPを介したものである可能性を示唆している。さらに、PACAP27の類似化合物であるVIPもPACAP27よりも効果は弱い β -アミロイドによる神経毒性低下作用を示した。また、最近発見されたヒト由来神経保護物質であるhumanin (Proc Natl Acad Sci USA (2001) 98 (11) 6336-6341) についても神経毒性低下作用を検討したが、やはりPACAP27よりも効果は弱いものの神経毒性低下作用を示した。

【0056】 【実施例8】 神経ペプチド類の濃度と神経毒性低下作用の関係

実施例2と同様にPC12細胞を培養して β -アミロイドを

*経毒性低下作用ありと判定した。その結果を表1及び表2に示す。

【0053】

【表1】

添加し、その際に様々な濃度の神経ペプチド類を共存させて神経毒性低下作用と濃度の関係について精査を行った。WST-8法によって細胞数を算出し、 β -アミロイドによる細胞死をどの程度減弱できたか数値化した。その結果を図6に示す。神経ペプチドPACAPは極めて低い濃度においても神経毒性低下作用を示し、その効果は 10^{-9} ~ 10^{-13} Mにおいて最も強力であった。また、VIPも比較的高濃度において強い神経毒性低下作用を示した。このことから、PACAPはVIPと比して少なくとも一万倍は強力である神経毒性低下作用を有することが明瞭に示された。

【0057】 【実施例9】 β -アミロイドによるカスパーゼ-3活性化作用と神経ペプチドによるその抑制効果
実施例2と同様に処理したPC12細胞を24 wellプレートにて培養し (2×10^5 cells/well)、 10^{-5} Mの β -アミロイドを添加し、その際にcAMP誘導体 (10^{-4} M) と神経ペプチドPACAP (10^{-9} M) を各々添加してアポトーシス関連酵素であるカスパーゼ-3の活性化作用を検討した。カスパーゼ-3の活性化作用は、カスパーゼ-3特異基質であるAc-DEVD-AMCを用いて行った。その結果を図7に示す。 β -アミロイドの添加によってカスパーゼ-3の活性は向上するが、cAMP誘導体の添加によってこの作用は著しく減弱化された。また、神経ペプチドPACAPの添加によっても完全ではないが約50%の抑制効果を示した。この結果によって、神経ペプチドのカスパーゼ系への作用が β -アミロイドに対する神経毒性低下作用に大きく関与している可能性が示唆された。ただし、この抑制作用は完全ではなかったことを考慮すれば、他の作

19

用機序も関与している可能性が考えられる。

【0058】

【発明の効果】本発明の神経毒性低下剤は、NO過剰産生に起因する細胞毒性及び β -アミロイドの蓄積に起因す

20

る細胞毒性を低下させることができ、神経変性疾患等の治療及び／又は予防に有効である。

【0059】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> ITOHAM FOODS INC.
 <120> Pharmaceutical composition having neurotoxicity-reducing action
 <130> P01-0945
 <160> 32
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Peptide
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> 4
 <223> Xaa represents Ala or Gly
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> 5
 <223> Xaa represents Ile or Val
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> 9
 <223> Xaa represents Asn or Ser
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> 11
 <223> Xaa represents Thr or Ser
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> 13
 <223> Xaa represents Leu or Tyr
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> 15
 <223> Xaa represents Lys or Arg
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> 17
 <223> Xaa represents Met or Leu or nLeu
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> 20
 <223> Xaa represents Lys or Arg or Gln

21

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 21

<223> Xaa represents Lys or Arg

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 24

<223> Xaa represents Asn or Ala

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 25

<223> Xaa represents Ser or Ala

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 26

<223> Xaa represents Ile or Val

<400> 1

His Ser Asp Xaa Xaa Phe Thr Asp Xaa Tyr Xaa Arg Xaa Arg Xaa Gln

1

5

10

15

Xaa Ala Val Xaa Xaa Tyr Leu Xaa Xaa Xaa Leu

20

25

<210> 2

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 2

Gly Lys

1

<210> 3

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 3

Gly Arg

1

<210> 4

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 4

Gly Lys Arg

1

23

24

<210> 5
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Peptide
<400> 5
Gly Arg Arg
1
<210> 6
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Peptide
<400> 6
Asn Gly Lys
1
<210> 7
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Peptide
<400> 7
Asn Gly Arg
1
<210> 8
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Peptide
<400> 8
Asn Gly Lys Arg
1
<210> 9
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Peptide
<400> 9
Asn Gly Arg Arg
1
<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>

25

<223> Synthetic Peptide

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 2

<223> Xaa represents Lys or Arg

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 3

<223> Xaa represents Lys or Arg

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 5

<223> Xaa represents Lys or Arg

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 7

<223> Xaa represents Lys or Arg

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 9

<223> Xaa represents Lys or Arg

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 11

<223> Xaa represents Lys or Arg

<400> 10

Gly Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Xaa Val Xaa Asn Xaa

1

5

10

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 3

<223> Xaa represents Lys or Arg

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 4

<223> Xaa represents Lys or Arg

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 6

<223> Xaa represents Lys or Arg

<220>

<221> PEPTIDE

27

28

<222> 8

<223> Xaa represents Lys or Arg

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 10

<223> Xaa represents Lys or Arg

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 12

<223> Xaa represents Lys or Arg

<400> 11

Asn Gly Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Xaa Val Xaa Asn Xaa

1

5

10

<210> 12

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 12

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln

1

5

10

15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys Arg Tyr Lys

20

25

30

Gln Arg Val Lys Asn Lys

35

<210> 13

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 13

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln

1

5

10

15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu

20

25

<210> 14

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 14

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln

1

5

10

15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn

20

25

29

<210> 15

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 15

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Arg Gln

1

5

10

15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Arg Arg Tyr Arg

20

25

30

Gln Arg Val Arg Asn Arg

35

<210> 16

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 16

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln

1

5

10

15

Met Ala Val Gln Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Arg Arg Tyr Arg

20

25

30

Gln Arg Val Arg Asn Lys

35

<210> 17

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 17

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Arg Gln

1

5

10

15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Val Leu

20

25

<210> 18

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 18

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln

1

5

10

15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu

20

25

<210> 19

31

32

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 19

His	Ser	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	
Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Leu					
			20					25							

<210> 20

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 20

His	Ser	Asp	Gly	Ile	Phe	Thr	Asp	Asn	Tyr	Thr	Arg	Leu	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	
Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Asn	Ser	Ile	Leu	Asn				
			20					25							

<210> 21

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 21

His	Ser	Asp	Gly	Ile	Phe	Thr	Asp	Ser	Tyr	Thr	Arg	Leu	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	
Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Asn	Ser	Ile	Leu	Asn				
			20					25							

<210> 22

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 22

His	Ser	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Tyr	Thr	Arg	Leu	Arg	Arg	Gln
1				5					10					15	
Leu	Ala	Val	Arg	Arg	Tyr	Leu	Asn	Ser	Ile	Leu	Asn	Gly	Lys		
			20					25				30			

<210> 23

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

33

<223> Synthetic Peptide

<400> 23

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Arg Gln

1

5

10

15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn Gly Lys Arg

20

25

30

<210> 24

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 24

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Arg Gln

1

5

10

15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn Gly Arg Arg

20

25

30

<210> 25

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 25

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Arg Gln

1

5

10

15

Ala Val Arg Arg Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn Gly Arg Arg

20

25

30

<210> 26

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 26

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Arg Gln

1

5

10

15

Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys

20

25

<210> 27

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 27

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Arg Gln

1 35 5 10 36
 Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys Arg
 20 25 30
 <210> 28
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Peptide
 <400> 28
 His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Arg Gln
 1 5 10 15
 Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Arg Arg
 20 25 30
 <210> 29
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Peptide
 <400> 29
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Arg Gln
 1 5 10 15
 Ala Val Arg Arg Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn Gly Arg Arg Tyr Arg
 20 25 30
 Gln Arg Val Arg Asn Arg
 35
 <210> 30
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Peptide
 <400> 30
 His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu
 20
 <210> 31
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Peptide
 <400> 31
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu
 20

37
 <210> 32
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Peptide
 <400> 11
 His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys Arg Tyr Lys
 20 25 30
 Pro Lys Arg Arg Asn Ser Gly Arg Arg Val Phe Tyr
 35 40

【0060】

【配列表フリーテキスト】配列番号1：XaaはAla又はGlyを表す（存在位置：4）

配列番号1：XaaはIle又はValを表す（存在位置：5）

配列番号1：XaaはAsn又はSerを表す（存在位置：9）

配列番号1：XaaはThr又はSerを表す（存在位置：11）

配列番号1：XaaはLeu又はTyrを表す（存在位置：13）

配列番号1：XaaはLys又はArgを表す（存在位置：15）

配列番号1：XaaはMet又はLeu又はnLeuを表す（存在位置：17）

配列番号1：XaaはLys又はArg又はGlnを表す（存在位置：20）

配列番号1：XaaはLys又はArgを表す（存在位置：21）

配列番号1：XaaはAsn又はAlaを表す（存在位置：24）

配列番号1：XaaはSer又はAlaを表す（存在位置：25）

配列番号1：XaaはIle又はValを表す（存在位置：26）

配列番号10：XaaはLys又はArgを表す（存在位置：2）

配列番号10：XaaはLys又はArgを表す（存在位置：3）

配列番号10：XaaはLys又はArgを表す（存在位置：5）

配列番号10：XaaはLys又はArgを表す（存在位置：7）

配列番号10：XaaはLys又はArgを表す（存在位置：9）

配列番号10：XaaはLys又はArgを表す（存在位置：11）

配列番号11：XaaはLys又はArgを表す（存在位置：3）

配列番号11：XaaはLys又はArgを表す（存在位置：4）

配列番号11：XaaはLys又はArgを表す（存在位置：6）

配列番号11：XaaはLys又はArgを表す（存在位置：8）

配列番号11：XaaはLys又はArgを表す（存在位置：10）

配列番号11：XaaはLys又はArgを表す（存在位置：12）

【図面の簡単な説明】

【図1】神経ペプチド類によるnNOS活性抑制作用を示す図である。

【図2】グルタミン酸によるNO産生と各種神経ペプチドによる細胞毒性抑制を示す図である。

【図3】細胞死を及ぼす β -アミロイドの影響を示す図である。

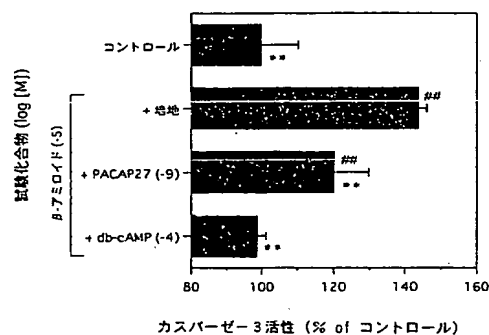
【図4】神経ペプチドの β -アミロイドに対する神経毒性低下作用の程度を示す図である。

【図5】神経ペプチドPACAP27、VIP、humanin、細胞透過性cAMP誘導体による神経毒性低下作用を示す図である。

【図6】神経ペプチド類の濃度と神経毒性低下作用との関係を示す図である。

【図7】 β -アミロイドによるカスパーゼ-3活性化作用と神経ペプチドによるその抑制効果を示す図である。

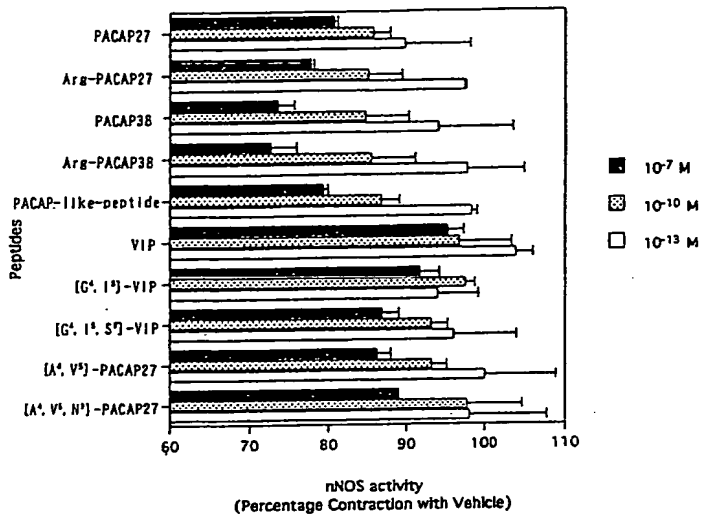
【図7】



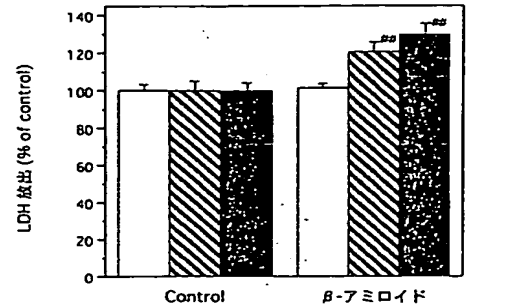
(##, $P < 0.01$; コントロールに対して)

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; β -アミロイド処理群に対して)

【図1】



【図3】



□ : 5%ウマ血清及び5%新生仔ウシ血清含有 DMEM
 ▨ : 0.25%ウマ血清及び0.25%新生仔ウシ血清含有 DMEM
 ■ : 0.2 μM インシュリン含有無血清 DMEM

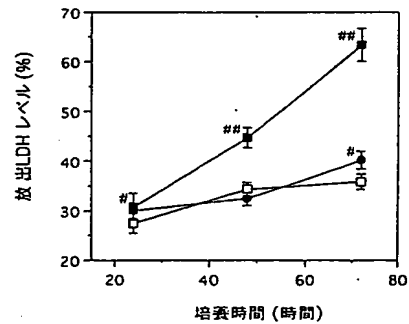
【図2】

Tested compounds (Concentration)	nNOS 活性 (%Control)	Cell viability (%Control)
Control	100.0 ± 15.6 ##	100.0 ± 8.6 ##
Glutamate (10 ⁻³ M) with		
Vehicle	193.0 ± 3.1 **	39.7 ± 6.1 **
L-NAME (10 ⁻⁴ M)	126.1 ± 32.2 ##	94.2 ± 2.8 ##
PACAP27 (10 ⁻⁷ M)	114.9 ± 24.1 ##	88.8 ± 9.2 ##
PACAP38 (10 ⁻⁷ M)	121.2 ± 35.8 ##	93.3 ± 21.9 ##
VIP (10 ⁻⁷ M)	144.7 ± 17.5 *	78.5 ± 2.1 ##

** P<0.01, *P<0.05 (with glutamate + vehicle)

** P<0.01, *P<0.05 (with Control)

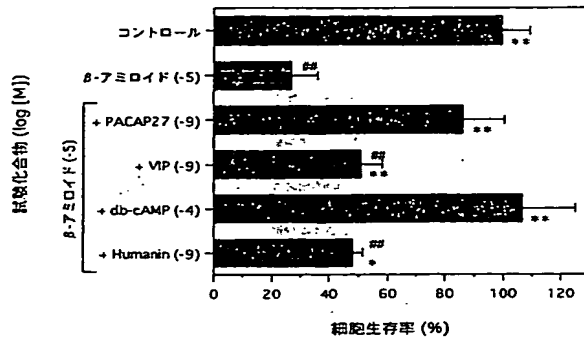
【図4】



□ : コントロール
 ■ : β-アミロイド 10⁻⁴ M
 ● : PACAP27 10⁻⁷ M

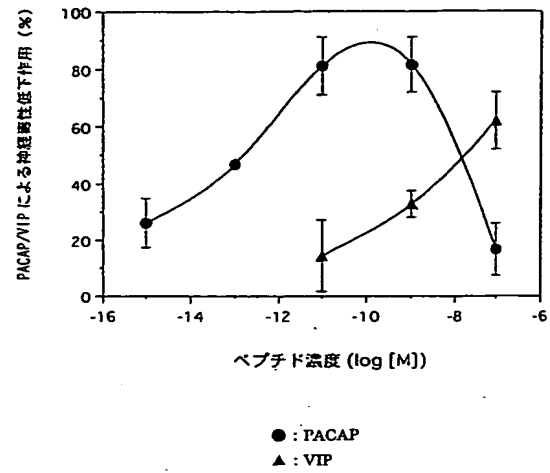
(*, P<0.05; **, P<0.01)

【図5】



(●, $P < 0.05$; ■, $P < 0.01$; コントロールに対して.
 *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; β-アミロイド処理群に対して)

【図6】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト (参考)
A 6 1 P 25/16		A 6 1 P 25/28	
25/28		39/02	
39/02		43/00	1 1 1
43/00	1 1 1	C 0 7 K 14/00	Z N A
// C 0 7 K 14/00	Z N A	A 6 1 K 37/24	

F タ-ム (参考) 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA19
 CA59 DB03 DB37 NA14 ZA15
 ZA16 ZA36 ZA54 ZC03 ZC04
 ZC19 ZC41
 4H045 AA10 AA30 BA09 BA17 BA18
 BA19 EA21 FA20 FA33